

# Functional significance of fatty acid translocase (FAT/CD36) in rodent cardiac muscle

Citation for published version (APA):

Brinkmann, J. F. F. (2003). *Functional significance of fatty acid translocase (FAT/CD36) in rodent cardiac muscle*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20030101jb>

## Document status and date:

Published: 01/01/2003

## DOI:

[10.26481/dis.20030101jb](https://doi.org/10.26481/dis.20030101jb)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

## Summary

The flow of blood through the vasculature is essential for supplying organs with oxygen and metabolic substrates and for removing waste products and heat. By providing the force for this flow, contraction of the heart is essential for maintaining normal cellular and organ function. Cardiac myocytes generate the mechanical force for contraction of the heart, and these cells preferentially use long-chain fatty acids (FA) as substrate for energy production.

Although FA are poorly soluble in aqueous environments their binding to proteins allows that physiologically significant concentrations can be reached. In the blood, FA travel bound to plasma albumin or they are complexed into the lipid core of circulating lipoproteins. Prior to their oxidation in the mitochondria of the cardiac myocytes, FA have to cross several barriers. FA first travel through the endothelium by a yet unidentified mechanism, they reach the interstitial space in which albumin is the FA carrier, and then cross the sarcolemma (plasma membrane) of the cardiomyocyte. In the cytoplasm of the cardiac myocyte FA associate with the low molecular mass heart-type FA binding protein (H-FABP) by which they are further transported to their site(s) of conversion or action. Initial studies indicated that the majority of the FA oxidized in the cardiomyocyte is translocated across the sarcolemma by a mechanism mediated by the integral membrane protein fatty acid translocase (FAT/CD36). The studies described in this thesis sought to determine the significance of FAT/CD36 in myocardial FA transport under both normal and pathophysiological circumstances.

A brief introduction to cardiac FA uptake and utilization and an outline of the thesis are presented in *Chapter 1*. For a long period of time FA were thought to pass plasma membranes by a spontaneous diffusional process. Though it has been clearly demonstrated that uncharged FA move rapidly across phospholipid bilayers, the presence of an additional protein-facilitated component in the transport of FA across adipocyte, hepatocyte and cardiac and skeletal muscle myocyte membranes led to the identification of three major candidate FA transport proteins named

plasma membrane fatty acid binding protein (FABP<sub>PM</sub>), fatty acid translocase (FAT), a protein more widely known as CD36, and fatty acid transport protein (FATP). Evidence for the involvement of FAT/CD36 as a membrane FA transporter in several tissues is quickly evolving due to the availability of several genetic models. These models, the current knowledge of the candidate FA transporters and the recently identified regulational mechanisms for FAT/CD36 are reviewed in *Chapter 2*.

The native FAT/CD36 protein was purified from total rat heart homogenates using a newly developed purification procedure to enable further investigation of the FAT/CD36 content that is present in cardiac myocytes (*Chapter 3*). This procedure was subsequently applied to purify a significant amount of FAT/CD36 from total rat heart tissue and isolated rat cardiomyocytes. These FAT/CD36 preparations showed identical molecular masses on SDS-PAGE gels, and western analysis did not reveal any differences in antigenicity. The FAT/CD36 contents of isolated rat cardiomyocyte and heart homogenate samples were found to be of comparable order of magnitude, which further demonstrated that FAT/CD36 is an abundantly expressed protein in the cardiomyocyte. Immunofluorescence labeling confirmed that at least part of the FAT/CD36 present is associated with the sarcolemma.

A new transgenic mouse model was characterized to further specify the function of FAT/CD36 in muscle FA transport. This gene-rescue model was raised on the FAT/CD36 null background. Gene-rescued (GR) mice re-expressed FAT/CD36 in heart and skeletal muscle under control of the mouse muscle creatine kinase promoter. Both western analysis and immunofluorescence labeling confirmed the muscle specific expression of FAT/CD36 in GR mice. Whereas FAT/CD36 null mice display fasting hypoglycemia and increased plasma triacylglycerol and FA concentrations, GR mice showed fasting plasma glucose, FA, and triacylglycerol levels that were restored to the respective levels found in wild-type animals. The FA oxidation rate of soleus muscle isolated from GR mice was significantly higher than the rate of soleus muscle from FAT/CD36 null mice and comparable to that found in muscle from wild type mice. Stimulation by

dipyridamole increased oxidation rates in wild type and GR muscles but did not affect oxidation in FAT/CD36 null muscle. Glycogen, triacylglycerol and ATP levels were significantly decreased in FAT/CD36 null muscles and fully normalized to WT levels in GR muscles. In contrast to the rescue of FA utilization in skeletal muscle, a normalization of FA oxidation was not observed in isolated GR hearts and GR cardiomyocytes. Both isolated FAT/CD36 null and GR hearts and their isolated cardiomyocytes showed drastically reduced FA oxidation rates compared to the wild-type. To examine the effect of FAT/CD36 on *in vivo* muscle function, the mice were subjected to forced swimming tests. FAT/CD36 null mice had a drastically reduced ability to endure exercise in comparison to both wild type and GR mice. The absence of FAT/CD36 in muscles thus directly and gene-specifically results in decreased FA utilization rates and a decreased ability to exercise (*Chapter 4*).

The role of FAT/CD36 in post ischemic functional recovery of the heart was examined in an isolated working mouse heart preparation (*Chapter 5*). The function of FAT/CD36 null and GR hearts was compared to wild-type hearts both before and after a period of global no-flow ischemia followed by reperfusion. FAT/CD36 null hearts had a similar cardiac output and a higher end-diastolic pressure than wild-type hearts. After ischemia, cardiac output was significantly lower and end-diastolic pressure significantly higher in FAT/CD36 null compared to wild-type hearts. Both defects were corrected in GR hearts. Moreover, hearts over-expressing FAT/CD36 displayed an increased tolerance to ischemia-reperfusion compared to their wild-type controls. To dissect out the role of FA uptake during the perfusions, experiments were also done in the presence of FA. The addition of palmitate to the perfusate improved heart functional recovery from ischemia in wild-type and GR, as well as in FAT/CD36 null hearts, but more dramatically in wild-type and FAT/CD36-rescued hearts as compared with the FAT/CD36 null hearts. FAT/CD36-mediated FA uptake thus is important for optimal myocardial recovery from ischemia and FAT/CD36 deficient hearts are more likely to fail following short ischemic episodes. This may reflect the

decreased ATP and glycogen levels of FAT/CD36 deficient hearts and their impaired ability to oxidize palmitate during recovery.

Hearts from wild-type and hetero- and homozygous H-FABP null mice were also analyzed in an isolated left ventricular ejecting mouse heart preparation (*Chapter 6*). Both before and after a period of severe, no-flow, normothermic ischemia followed by reperfusion, significant differences in hemodynamic performance were absent and the hearts of all three groups showed a similar post-ischemic functional recovery. In addition, measuring the contents of high-energy phosphates and glycogen did not reveal any difference in cardiac energetic status among the groups. These data demonstrate that endogenous H-FABP does not exert a cardioprotective function in the heart during ischemia-reperfusion.

The main results and conclusions of the studies described in this thesis are further discussed in *Chapter 7*. FAT/CD36 plays a key role in cardiac and skeletal muscle metabolism as a mediator of transmembrane FA transport. The effects of FAT/CD36 deficiency become apparent under heightened metabolic demands such as occurring during ischemia and appear more severe than the effects of H-FABP deficiency. The differences of metabolic phenotypes, the possible roles for FATP and FABP<sub>PM</sub> are discussed and this chapter concludes with some directions for future results.

## **Samenvatting**

Organen worden voorzien van zuurstof en voedingsstoffen door middel van een continue bloedstroom door het bloedvatstelsel. Daarnaast worden de door weefsels gevormde afvalproducten en warmte via de bloedstroom afgevoerd. Door de contractie van het hart wordt het bloed rondgepompt en dit is essentieel voor het functioneren van weefsels en organen. Het samentrekken van hartspiercellen (cardiomyocyten) ligt ten grondslag aan de contractie van het hart en dit is een energievergend proces. Hoewel cardiomyocyten ook andere chemische stoffen zoals glucose verbruiken, maken deze cellen bij voorkeur energie vrij door de verbranding van langketenige vetzuren, een proces dat plaatsvindt in de mitochondria van de cel.

Voordat vetzuren verbrand kunnen worden in de cardiomyocyten moeten deze verbindingen eerst een aantal barrières passeren. Langketenige vetzuren, verder vetzuren genoemd, zijn slecht oplosbaar in een waterige omgeving. De concentraties die normaal in het lichaam aanwezig zijn worden mogelijk gemaakt doordat vetzuren binden aan specifieke eiwitten. Vetzuren in het bloed worden gebonden door albumine of ze bevinden zich in een complex met circulerende lipoproteïnes. Vanuit het bloed bereiken ze eerst de endotheelcellaag van de haarvaten. Nadat ze deze laag gepasseerd zijn via een tot nu toe onopgehelderd mechanisme bereiken ze de interstitiële ruimte. Deze ruimte overbruggen ze gebonden aan albumine, waarna de vetzuren het sarcolemma (de plasmamembraan) van de cardiomyocyten bereiken en passeren. In het cytoplasma van de cardiomyocyt binden vetzuren aan het hart-type vetzuurbindend eiwit (H-FABP voor "heart-type fatty acid-binding protein") en in deze vorm worden ze verder getransporteerd binnen de cel. Recentelijk zijn aanwijzingen verkregen dat vetzuren het sarcolemma van de cardiomyocyt passeren met behulp van een eiwit genaamd "fatty acid translocase", dat aanwezig is in de fosfolipide dubbellaag van het sarcolemma. De studies die in dit proefschrift beschreven worden, onderzoeken de betekenis van dit eiwit voor het functioneren van het hart onder zowel normale als pathofysiologische omstandigheden.

Een korte introductie over de opname en verbranding van vetzuren in het hart, alsmede een beschrijving van de opzet van dit proefschrift zijn gegeven in *Hoofdstuk 1*. Lange tijd werd gedacht dat vetzuren de plasmamembraan passeren via een spontaan optredend diffusieproces en het is inderdaad overtuigend aangetoond dat ongeladen vetzuren zich snel door fosfolipide dubbellagen kunnen verplaatsen. De aanwezigheid van een additionele, eiwit-gefaciliteerde component in het vetzuurtransport over de celmembraan van vetcellen, levercellen en hart- en skeletspiercellen heeft geleid tot de identificatie van drie kandidaat vetzuurtransporteiwitten genaamd "plasma membraan fatty acid binding protein" (FABP<sub>PM</sub>), "fatty acid translocase" (FAT), een eiwit dat ook bekend is als CD36, en "fatty acid transport protein" (FATP). Het bewijs dat FAT/CD36 in verschillende weefsels betrokken is bij het transport van vetzuren over de plasmamembraan groeit snel doordat een aantal genetische modellen beschikbaar is gekomen. Deze modellen, de huidige kennis van de drie kandidaat vetzuurtransporters en het moleculaire mechanisme van de regulatie van FAT/CD36 worden beschreven in *Hoofdstuk 2*.

Om het gehalte aan FAT/CD36 dat aanwezig is in de cardiomyocyt nader te kunnen onderzoeken, is een nieuwe procedure ontwikkeld om het natieve FAT/CD36 te zuiveren uit gehomogeniseerde rattenharten (*Hoofdstuk 3*). Deze methode is vervolgens gebruikt om een significante hoeveelheid FAT/CD36 te zuiveren uit geïsoleerde ratten-cardiomyocyten. De eiwitten gezuiverd uit harten en cardiomyocyten hadden identieke schijnbare moleculaire massa's op SDS-PAGE gels en beide eiwitten vertoonden dezelfde antigeniciteit bij western analyse. Geïsoleerde ratten cardiomyocyten en hart-homogenaten bleken vergelijkbare hoeveelheden FAT/CD36 te bevatten, hetgeen aantoont dat FAT/CD36 hoog tot expressie komt in de hartspiercel. Het immunofluorescente labelen van hartweefsel secties bevestigde dat op zijn minst een deel van het FAT/CD36 geassocieerd is met het sarcolemma. De relatief hoge gehalten aan en de sub-cellulaire lokalisatie van FAT/CD36 in de cardiomyocyt zijn in overeenstemming met de verwachte rol bij het transsarcolemmale transport van vetzuren.

Een nieuw muismodel is gekarakteriseerd om de bijdrage van FAT/CD36 aan het transport van vetzuren in spierweefsel nader te specificeren. Dit transgene model (GR genoemd, voor gene-rescued) is gegenereerd op de genetische achtergrond van de FAT/CD36 deficiënte muis en bracht FAT/CD36 tot re-expressie in hart en skeletspier onder controle van de spier-specifieke creatine kinase promotor. Zowel western analyse als immunofluorescentie studies toonden aan dat FAT/CD36 spier-specifiek tot expressie kwam in de GR muis. FAT/CD36 deficiënte muizen hebben een verlaagde plasma glucose concentratie en verhoogde plasma triacylglycerol- en vetzuurconcentraties na overnacht vasten. Deze parameters bleken genormaliseerd in de GR muis, dat wil zeggen dat de GR muizen gevaste plasma glucose-, triacylglycerol- en vetzuurconcentraties hadden die vergelijkbaar waren met de concentraties in wild-type muizen. De vetzuuroxidatiesnelheid van een skeletspierspier, de soleus, geïsoleerd uit de poot van GR muizen, was significant hoger dan de oxidatiesnelheid van de soleus uit FAT/CD36 deficiënte muizen, en vergelijkbaar met de oxidatiesnelheid van spieren uit de wild-type muizen. De vetzuuroxidatiesnelheid door wild-type en GR spieren was hoger na de toevoeging van dipyridamole, terwijl dit effect niet aanwezig was in FAT/CD36 deficiënte soleus spieren. Dipyridamole is een verbinding die de translocatie van FAT/CD36 vanuit intracellulaire opslagplaatsen naar de celmembraan stimuleert. Glycogeen, triacylglycerol en ATP concentraties waren significant verlaagd in de FAT/CD36 deficiënte skeletspier en volledig genormaliseerd tot wild-type niveaus in GR skeletspieren. Het effect van FAT/CD36 deficiëntie op de *in vivo* functie van de skeletspier is onderzocht door middel van een gedwongen zwemtest. Vergelijken met zowel wild-type als GR muizen hadden FAT/CD36 deficiënte muizen een drastisch verlaagd uithoudingsvermogen tijdens deze test. De afwezigheid van FAT/CD36 in de skeletspier leidt dus direct en gen-specifiek tot verlaagde vetzuuroxidatiesnelheden en een verlaagd uithoudingsvermogen gedurende zware inspanning. Een verrassende bevinding was dat GR harten en cardiomyocyten, in tegenstelling tot de GR skeletspieren, geen normalisatie van de vetzuuroxidatie vertoonden. Zowel geïsoleerde FAT/CD36 deficiënte als GR harten en de hieruit geïsoleerde



cardiomyocyten oxideerden veturen met een significant verlaagde snelheid ten opzichte van wild-type harten en cardiomyocyten. Een verklaring voor de verschillen tussen hart- en skeletspier is op dit moment nog niet voorhanden (*Hoofdstuk 4*).

De rol van FAT/CD36 in het post-ischemische functionele herstel van het hart is onderzocht met behulp van geïsoleerde, met buffer geperfundeerde muizenharten (*Hoofdstuk 5*). Het hemodynamisch functioneren van FAT/CD36 deficiënte en GR harten is hierbij zowel voor als na een periode van globale ischemie, opgelegd door het stoppen van de toevoer van buffer, gevolgd door reperfusie vergeleken met de functie van wild-type harten. Het pompvermogen van FAT/CD36 deficiënte harten was vergelijkbaar met die van wild-type harten, terwijl de eind-diastole druk van het FAT/CD36 deficiënte hart verhoogd bleek. Na een periode van ischemie bleek het pompvermogen van FAT/CD36 deficiënte harten significant verlaagd en de eind-diastole druk significant verhoogd ten opzichte van wild-type harten. Beide defecten waren gecorrigeerd in GR harten. Ook bleken harten afkomstig uit muizen die FAT/CD36 tot over-expressie brengen beter bestand tegen ischemie dan wild-type controle harten. Om de rol van het vetzuurmetabolisme gedurende reperfusie nader te analyseren zijn ook vergelijkbare experimenten uitgevoerd met de aanwezigheid van vetzuren in de gebruikte buffer. De toevoeging van palmitaat aan de perfusie-buffer had een positief effect op het functionele herstel van zowel FAT/CD36 deficiënte, als van GR en wild-type harten. Dit effect was echter aanmerkelijk meer uitgesproken voor wild-type en GR harten. Gezamenlijk tonen deze resultaten aan dat de door FAT/CD36 gemedieerde opname en de daarop volgende oxidatie van vetzuren belangrijk is voor een optimaal herstel van het hart na ischemie. Het FAT/CD36 deficiënte hart is daardoor waarschijnlijk minder goed bestand tegen korte periodes van verminderde bloedtoevoer. Het verminderde vermogen om palmitaat te oxideren gedurende de herstelperiode en de gevonden verlaging van ATP en glycogeen concentraties in het FAT/CD36 deficiënte muizenhart lijken hieraan ten grondslag te liggen.

Ook harten van wild-type, hetero- en homozygote H-FABP deficiënte muizen zijn geanalyseerd in een geïsoleerd werkend muizenhart model (*Hoofdstuk 6*).

Significante verschillen in het hemodynamisch functioneren waren afwezig zowel vóór als na een periode van zware, normothermische ischemie gevolgd door reperfusie. Harten uit de drie verschillende muis-typen vertoonden een vergelijkbaar vermogen om te herstellen van de opgelegde ischemische periode. De energetische status van de H-FABP gemanipuleerde harten na reperfusie was vergelijkbaar met de status van wild-type harten, hetgeen gedemonstreerd werd door gemeten gehalten aan hoog-energetische fosfaten en glycogeen. In tegenstelling tot verschillende gepostuleerde hypothesen tonen deze data op een elegante manier aan dat H-FABP geen beschermende rol speelt in het hart tijdens ischemie-reperfusie.

De belangrijkste resultaten en conclusies van de in dit proefschrift beschreven studies worden verder bediscussieerd in *Hoofdstuk 7*. Als mediator van het vetzuurtransport over het sarcolemma speelt FAT/CD36 een belangrijke rol in het metabolisme van hart- en skeletspiercellen. De effecten van FAT/CD36 deficiëntie worden duidelijk waarneembaar onder metabool veeleisende omstandigheden als ischemie-reperfusie en lijken ernstiger dan de effecten van H-FABP deficiëntie. De verschillen in metabole fenotypes en de mogelijke rol van FATP en FABP<sub>PM</sub> bij de vetzuuropname worden bediscussieerd en dit hoofdstuk eindigt met enige suggesties voor toekomstig onderzoek. De beschikbaarheid van verschillende genetische modellen voor FAT/CD36 heeft zijn waarde bewezen. Verdere karakterisering van deze modellen zal waardevolle informatie opleveren over de interactie tussen het metabolisme van vetzuren en het metabolisme van andere belangrijke substraten. Samen met de opheldering van het moleculaire mechanisme waarmee FAT/CD36 de vetzuuropname beïnvloed zal deze kennis bijdragen aan het begrip van de ontwikkeling van ernstige pathologieën als hypertrofie, hartfalen en diabetes.

